

体細胞クローン牛とその娘牛および孫牛の 三世代にわたる発育、繁殖および産乳性調査

白石 徹¹⁾・大橋秀一¹⁾・上田淳一¹⁾・和田千雅²⁾・兼子松義³⁾

摘要：愛知県農業総合試験場では、米国から輸入したホルスタイン種雌牛（愛知県畜産総合センター飼養）をドナーとして用い、2002年1月22日に体細胞クローン牛を作出した。

体細胞クローン本牛から娘牛および孫牛までの三世代について追跡調査を行った。本牛と娘牛については、発育性を調査するとともに、繁殖性や産乳性について調査した。孫牛については交雑種のため、発育（肥育）調査を実施後、解剖調査を行った。本牛と娘牛は、2012年5月31日に鑑定殺により病理学的調査、生化学的調査及び遺伝子学的調査を実施した。

- 1 本牛および娘牛は発育性、繁殖性及び産乳性に異常はなかった。
- 2 孫牛も発育性、繁殖性および解剖所見に異常は認められなかった。
- 3 本牛と娘牛は、どちらも病理学的、血液生化学的および遺伝子学的所見に異常は認められなかった。

当場で生産された体細胞クローン牛、娘牛および孫牛の体細胞クローン由来の三世代を調査した結果、一般牛と比べて異常な所見は得られなかった。

キーワード：体細胞クローン牛、娘牛および孫牛、発育性、繁殖性、産乳性

Investigation of Growth, Breeding and Milk Production of a Cow Cloned from Somatic Cells, Its Progeny Cattle and a Grandchild

SHIRAIISHI Toru, OoHASHI Syuuichi, UEDA Junichi
WADA Kazumasa and KANEKO Matsuyoshi

Abstract: A cow cloned from somatic cells was derived using the donor cells of a high-lactating Holstein cow in January 22, 2002.

A follow-up survey of the cloned cow was conducted for approximately 3 generations. Normality was assessed by conducting growth, reproductive, and milking trials. The progeny of the third generation, a hybrid of Holstein and Japanese-black, were evaluated by a fattening trial. Eventually, all the cattle were dissected, and pathological, biochemical, and genetic assessments of the somatic cell cloned cow and its progeny were conducted in May 31, 2012.

1. The somatic cell-cloned cow and its progeny showed no abnormality in growth, reproductive, and milking performances.
2. The hybrid third-generation cattle produced from the progeny cattle showed no abnormalities in the internal organs, growth and reproductive.
3. The cloned cow and its progeny appeared to be pathologically and genetically normal, and their blood profiles were within the normal range.

Thus, the cloned cow and its 3 progeny generations showed the same functions as normal cows.

Keywords: Somatic cell cloned cattle, Progeny cattle and a grandchild,
Growing performance, Reproductive performance, Milking performance

緒言

体細胞クローン技術は、ドナーとなる核を含む細胞を別の除核した未受精卵子に入れ、電氣的な融合刺激により胚を発生させ、代理の母牛の子宮に移植する方法で、特定の牛の細胞を基に、同一の遺伝子を持つ個体を増殖することができる。

1996年にイギリスで誕生した羊「ドリー」¹⁾に端を発し、国内では1998年に石川県で世界初の体細胞クローン牛が誕生²⁾してから急速にクローン研究が進められた。愛知県農業総合試験場（以下、当場）の体細胞クローン研究は、1999年に近畿大学との連携研究から開始された。2000年には上田ら³⁾が雌牛の卵丘細胞をドナー細胞として用い、体細胞クローン牛を作出した成果について報告している。

体細胞クローン牛は、受胎から出生まで順調に進まなかったり、出生しても無事に成長しないことも多い。

そのような中、2002年に愛知県畜産総合センター飼養の輸入ホルスタイン雌牛（以下、ドナー牛）の体細胞を基に、小林ら⁴⁾の方法（Open pulled Straw法：OPS）を用いて、ガラス化保存した核移植胚（以下、NT胚）としては国内2例目となる体細胞クローン雌牛が当場で無事誕生した。その後、人工授精（以下、AI）により娘牛及び孫牛までの三世代を作出した（図1）。

筆者らは、今回、生産された体細胞クローン雌牛、娘牛及び孫牛について、AIや受精卵移植により生産された通常の牛（以下、一般牛）との発育性や生理機能の違いを調査した。2008年8月に孫牛について解剖調査を実施し、2012年5月には、体細胞クローン雌牛と

娘牛を鑑定殺し、血液生化学、病理学及び遺伝子学的な異常の有無を調査したので、その概要を報告する。

材料及び方法

1 体細胞クローン雌牛の調査

米国产ドナー牛（1987年10月29日産まれ、名号ウオークアップ バリエント マンデイ イーティー）の卵巣から経膈採取した卵丘細胞（ドナー細胞）を基にNT胚を生産し、OPSによるガラス化保存後、2001年4月23日に移植液に戻し、非外科的方法（頸管経由法）によりレシピエント（受胎牛）に移植を行い受胎した。

(1) 出生調査

体細胞クローン牛を出産する際には、過大子になることも多いと報告^{5, 6)}されていることから、妊娠期間の延長による胎子の過大発育を防止するため、分娩予定の2日前に受胎牛に副腎皮質ホルモン（デキサメサゾン）と、1日前に黄体退行ホルモンであるプロスタグランジンとエストラジオール（E2）を投与して分娩誘起し、2002年1月22日に体細胞クローン雌牛「アイフォーチュン NT」（以下、「アイ」）が誕生した。「アイ」について、出生状況、外貌および生時体重を調査した。

「アイ」の出生後は、ドナー牛との遺伝的な同一性を確認するため、家畜改良事業団へ遺伝子検査を依頼した。また、3か月齢時には、体細胞クローン牛では短縮を示すことがあるテロメア長（染色体の末端に存在するDNAとテロメア結合タンパク質の複合体の長さ）について、DNAを抽出後、TAGGG Telomere Length Assayを使用し、サザンハイブリダイゼーションにより解析を行い、当場の同月齢の一般牛と比較した。

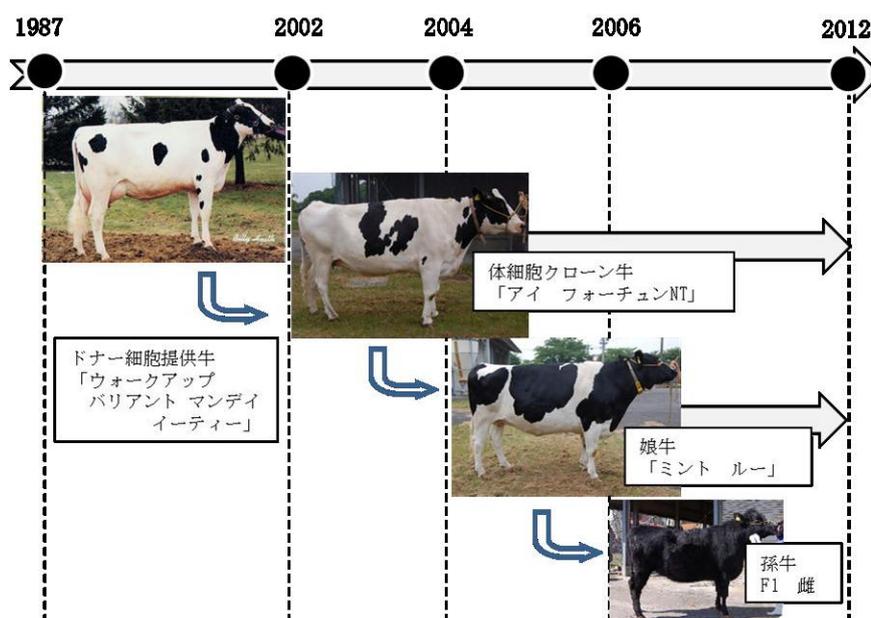


図1 ドナー牛と「アイ」の三世代の相関図

(2) 発育調査

0～390日齢（繁殖し始める13か月齢）までの「アイ」の体格（体重、胸囲、体高、かん幅）を測定し、一般牛（ホルスタイン種）の指標となる日本ホルスタイン登録協会（以下、日ホ）の標準発育値と比較した。なお、飼料給与を体重200 kgまでは、乾物中の可消化養分総量（TDN）71.1%、粗蛋白質（CP）16.6%、200 kg以降は乾物中のTDN 69.1%、CP 15.8%で設計した。

また、20か月齢時（妊娠鑑定終了時）に体格（体重）を測定し、日ホの標準発育値と比較した。

(3) 繁殖性調査

「アイ」の春機発動日数、発情周期日数について調査した。発情周期を確認した後、2003年5月20日にホルスタイン種精液によるAIを開始し、受胎するまでのAI回数について調査した。また、妊娠期間と分娩時の母牛の状態を調査した。

(4) 産乳性調査

「アイ」（初産）の305日間実乳量及び乳成分について調査し、平成16年「乳用牛群能力検定成績まとめ」年型別の2年型（初産）の全国成績と比較した。

(5) 血液生化学調査

「アイ」の血液を用い、別表のとおりRBC（赤血球）、WBC（白血球）数のほか、各血液生化学成分の22項目について、富士ドライケム3000V（富士フィルム株式会社、東京）を用いた自動分析装置により調査を行った。

(6) 病理学的調査

「アイ」を2012年5月（10歳時）に中央家畜保健衛生所高度病性鑑定課にて鑑定殺後、外貌、各臓器について肉眼的な観察を行った後、各臓器についてはホルマリン保存後に病理組織切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色（HE染色）等による組織学的観察を行った。

(7) 遺伝子学的調査

「アイ」から採材した、血液と各臓器を、独立行政法人農業・食品産業研究機構畜産草地研究所（以下、(独)畜産草地研究所）へ送付し、遺伝子発現の異常を確認するため、DNAメチル化の有無について調査を依頼した。なお、対照牛には(独)畜産草地研究所飼養の10歳9か月齢の一般牛（黒毛和種）を用いた。各臓器と血液について、NucleoSpin[®]Tissueキット（タカラバイオ株式会社、東京）を用いてゲノムDNAを調整し、バイサルファイト処理を行った。バイサルファイトPCR条件およびプライマーは既報^{7) 8)}に従った。PCR産物をpGEM-T (Easy) Vector Systems（プロメガ株式会社、東京）を用いてクローニングし、各サンプルごとに16クローンをシーケンス解析しDNAメチル化の状態を解析した。

2 娘牛の調査

「アイ」はAIにより、娘牛「ミントルー」（以下、「ミント」）を分娩したため、以下の調査を実施した。

(1) 出生調査

娘牛「ミント」の出生状況、産子の外貌および生時体重について調査した。

(2) 発育調査

娘牛「ミント」は、「アイ」と同じ20か月齢時（繁殖供用中）に体格（体重）を測定し、日ホの標準発育値と比較した。

(3) 繁殖性調査

娘牛「ミント」の春機発動日数、発情周期日数について調査した。発情周期を確認した後、2005年7月11日に黒毛和種種精液によるAIを開始し、受胎するまでのAI回数について調査した。また、妊娠期間と分娩時の母牛の状態を調査した。

(4) 産乳性調査

娘牛「ミント」（初産）の305日間実乳量及び乳成分について調査し、平成18年「乳用牛群能力検定成績まとめ」年型別の2年型（初産）の全国成績と比較した。

(5) 血液生化学調査

娘牛「ミント」も「アイ」と同様の材料および方法により調査を実施した。

(6) 病理学的調査および遺伝子学的調査

娘牛「ミント」も「アイ」と同じ2012年5月（8歳時）に鑑定殺を行い、同様の調査を実施した。

3 孫牛（F1雌）の調査

娘牛「ミント」はAIにより、「アイ」の孫となる交雑種（F1雌）を分娩したため、下記の調査を実施した。

(1) 出生調査

孫牛について、出生状況、外貌および生時体重を調査した。

(2) 繁殖性調査

孫牛はF1のため、繁殖は行わなかったが、雌であったので春機発動日数、発情周期日数を調査した。

(3) 発育（肥育）調査

孫牛について、同時期の肥育試験として供用（同居）した一般牛（F1雌牛）を対照として、発育性（体重、体高、胸囲の推移）を比較した。

飼料給与を5～8か月齢はTDN 74%、CP 18%で、8か月以降はTDN 74%、CP 14%で設計した。

(4) 解剖による調査

孫牛は2008年8月（23か月齢）に解剖を実施し、骨格、筋肉および生殖器等の各臓器の異常の有無について調査した。

試験結果

1 体細胞クローン雌牛の調査

(1) 出生調査

「アイ」は2002年1月22日に自然（正常）分娩された。妊娠期間は280日、生時体重51 kgであった。分娩時は若干羊水を飲んだが、自力で起立した。健康状態も良好であり、初乳を1.5 kg摂取した。母牛も分娩後の体調は良好であった。

「アイ」の遺伝的な同一性の確認検査では、家畜改良事業団から、「アイ」はドナー牛と遺伝的に同一であると推定されるとの結果が得られた。

生後3か月齢のテロメア長について当場の同月齢の一般牛と比較すると、21 kbで同じであった。ドナー牛のテロメア長については、一般牛より短かった(表1)。

(2) 発育調査

「アイ」の繁殖適期の390日齢までの発育の推移は、図2のとおりで、300日齢付近でやや増体率の低下があったが、全ての項目で日齢が指標とするホルスタイン雌牛の標準発育値の範囲内か上限を上回っていた。

20か月齢時の発育値は、表2のとおり体重550.0 kg、体高143.0 cmで、日齢が指標とするホルスタイン雌牛の標準発育値を大きく上回っていた。

(3) 繁殖性調査

繁殖性については、表3のとおり春機発動日数324日、発情周期21.3日で、一般牛と同等の範囲内であった。

また、「アイ」は、2003年6月11日にAI 2回目で受胎した。受胎月齢は16か月齢であった。娘牛「ミント」を自然分娩し、妊娠期間は279日(2004年3月16日分娩)であった。母子とも健康状態は良好であった。

(4) 産乳性調査

305日実乳量は7004 kgで、同時期の乳用牛群能力検定全国成績の範囲内であった(表4)。

表1 テロメア長

対象牛	「アイ」 (3か月齢)	一般牛 (3か月齢)	ドナー牛 (14歳)
テロメア長	21 kb	21 kb	12 kb

乳成分についても、「アイ」は乳脂率3.80%、乳蛋白質率3.30%で、全国の平均(乳脂率3.91%、乳蛋白質率3.28%)と有意な差はなかった。

(5) 血液生化学的検査

「アイ」はRBC 780万/mm³、WBC 6.4千/mm³で正常範囲内であった。また、Ca値がやや低かったものの、T-CHO(総コレステロール)は正常範囲内であった。免疫機能の指標となるG1b(グロブリン)の測定ができなかったが、T-P(総蛋白質)がやや高めで、A1Bが正常範囲内であった。さらに、GPT(ALT)が高かったが、その他の項目は正常範囲内であった(表5)。

(6) 病理学的調査

「アイ」の病理学的所見は、表6のとおりであった。肝臓の一部に富脈斑(肝臓の洞様毛細血管の限局的拡張)や腎臓にリボフスチン色素の沈着が認められたが、甲状腺のほか、各臓器に組織学的異常は認められなかった(図3、図4、図5)。

(7) 遺伝子学的調査

「アイ」と一般牛の各臓器におけるH19遺伝子およびPEG3遺伝子のDNAメチル化レベルの状態は表7、表8のとおりであった。一般牛との比較では、脾臓でH19遺伝子のメチル化が有意に低かった(34.4% vs. 79.0%、 $P=0.0116$)が、他の臓器については臓器間でメチル化の違いはあるものの、同じ臓器では有意にメチル化が変動しているものは無く、顕著なメチル化レベルの異常は確認できなかった($P<0.05$ 、Mann-Whitney U-test)。

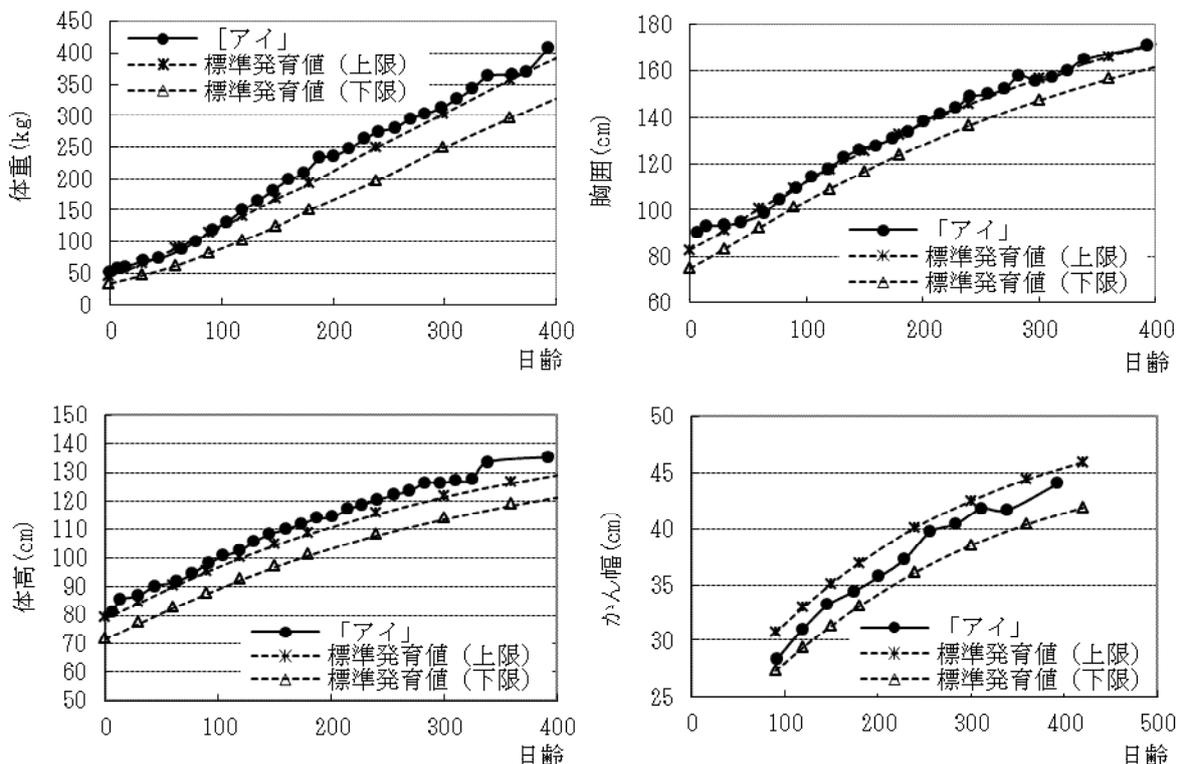


図2 「アイ」の発育の推移(0~390日齢)

2 娘牛の調査

(1) 出生調査

娘牛「ミント」は2004年3月16日に自然（正常）分娩され、分娩時体重は43 kgであった。自力で起立し、初乳も2.0 kg飲み、外貌にも異常は認めなかった。

(2) 発育調査

娘牛「ミント」の「アイ」と同時期である20か月齢時の発育値は、表2のとおり体重498.0 kg、体高135.0 cmで、日ホが指標とするホルスタイン雌牛の標準発育値の範囲内であった。

(3) 繁殖性調査

繁殖性については、表3のとおり娘牛「ミント」の春機発動日数336日、発情周期21.8日で、一般牛と同等の範囲内にあった。娘牛「ミント」は2005年11月21日のAI3回目で受胎した。受胎月齢は20か月齢であった。F1雌牛を自然分娩し、妊娠期間284日（2006年9月1日分娩）であった。母子とも健康状態は良好であった。

(4) 産乳性調査

娘牛「ミント」の305日実乳量は7549 kgで、同時期の乳用牛群能力検定全国成績の範囲内であった（表4）。

乳成分についても、乳脂率3.90%、乳蛋白質率3.30

%で全国の平均（乳脂率3.89%、乳蛋白質率3.28%）と有意な差はなかった。

(5) 血液生化学的検査

RBC 600万/mm³、WBC 8.0千/mm³で正常範囲内であった。また、CPK（クレアチニン）は「アイ」より低かったものの正常範囲内であった。その他の項目は「アイ」と同様で、多くは正常範囲内であった（表5）。

(6) 病理学的調査

娘牛「ミント」の病理学的所見は、表6のとおりであった。「アイ」と同様に、腎臓にリポフスチン色素の沈着が認められたものの、甲状腺のほか、各臓器に組織学的異常は認められなかった（図3、4、5）。

(7) 遺伝子学的検査

娘牛「ミント」及び一般牛の各臓器におけるH19 遺伝子およびPEG3 遺伝子のDNAメチル化レベルの状態は表7、表8のとおりであった。一般牛との比較では、脾臓でPEG3 遺伝子が有意に低かった（24.6% vs. 73.3%、 $P=0.0016$ ）が、その他の臓器については有意にメチル化が変動しているものは無く、顕著なメチル化レベルの異常は確認できなかった。

表2 「アイ」と娘牛「ミント」の発育成績

対象牛	体重 (kg)	(20か月齢時)	
		体高(cm)	
「アイ」	550.0	143.0	
娘牛「ミント」	498.0	135.0	
標準範囲	446.5~521.5	130.7~138.7	

表3 春機発動日数と発情周期

対象牛	春機発動日数	発情周期
「アイ」	324日	21.3日
娘牛「ミント」	336日	21.8日
孫牛(F1)	349日	22.0日
標準範囲	180~390日	18~25日

表4 「アイ」（2004年）と娘牛「ミント」（2006年）の乳量成績

対象牛	乳量(kg)	乳成分(%)	
		乳脂率	乳蛋白質率
「アイ」	7004	3.80	3.30
全国の範囲	6784~9882	3.91±0.49	3.28±0.21
娘牛「ミント」	7549	3.90	3.30
全国の範囲	6845~9987	3.89±0.47	3.28±0.21

表5 「アイ」と娘牛「ミント」の血液生化学検査成績

項目	「アイ」	娘牛「ミント」	正常値
RBC (赤血球数)	780	600	600~800
WBC (白血球数)	6.4	8.0	5~12
Ht (ヘマトクリット)	39	37	24~48
GGT (γ-GTP)	19	16	15~25
LDH (乳酸脱水素酵素)	900<	900<	2540±690
T-Bil (総ビリルビン)	0.7	0.6	0.0~1.4
Cre (クレアチニン)	1.0	1.1	1~2
T-CHO (総コレステロール)	105	106	90~250
Mg (マグネシウム)	2.3	2.2	2~4
UA (尿酸)	1.4	1.1	-
IP (無機リン)	4.8	4.9	4.5~5.5
Ca (カルシウム)	7.7	7.8	11.08±0.67
CHE (コリンエステラーゼ)	1	1	-
TG (中性脂肪)	17	4	15~50
CPK (クレアチンキナーゼ)	104	88	66~120
GOT (AST)	53	60	56±14
GPT (ALT)	26	27	16±8
TP (総タンパク質)	8.0	7.9	6~7.5
GLU (グルコース)	72	71	35~120
ALB (アルブミン)	2.9	2.9	2.8~3.8
BUN (尿素窒素)	13.9	12.9	12~16
ALP (アルカリフォスファターゼ)	154	145	20~150

RBCの単位は万/mm³、WBCの単位は千/mm³、Htの単位は%
GGT、LDH、CHE、CPK、GOT、GPT、ALPの7項目の単位はU/l
T-Bil、Cre、T-CHO、Mg、UA、IP、Ca、TG、GLU、BUNの10項目の単位はmg/dl

TP、ALBの2項目の単位はg/dl

表6 解剖・病理組織学的所見

対象牛	「アイ」	娘牛「ミント」
解剖所見	・肝臓の富脈斑	・腸間膜の脂肪壊死
組織所見	・脾臓のうっ血、リンパ濾胞の萎縮 ・腎臓のリボスチン沈着、空胞変性 ・心臓の一部に弧発性心筋壊死	・同左（うっ血） ・同左（色素沈着） ・小腸のうっ血 ・卵巣の嚢胞形成

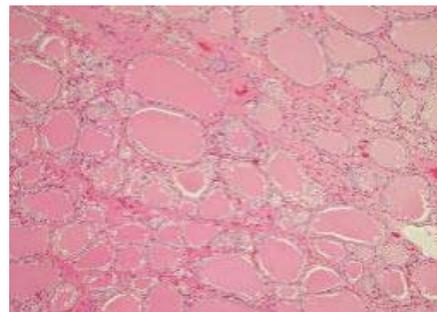
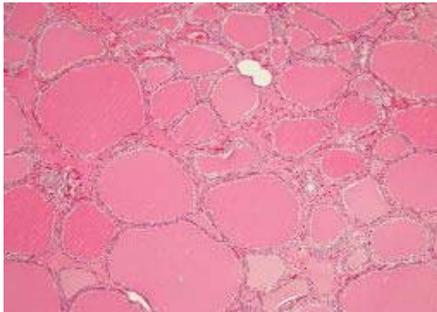


図3 甲状腺の組織写真(左：「アイ」、右：娘牛「ミント」)

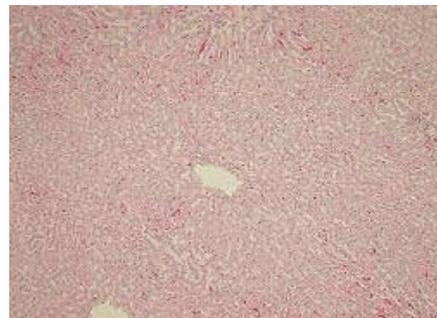
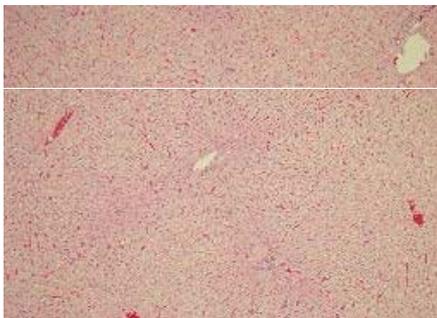


図4 肝臓の組織写真(左：「アイ」、右：娘牛「ミント」)

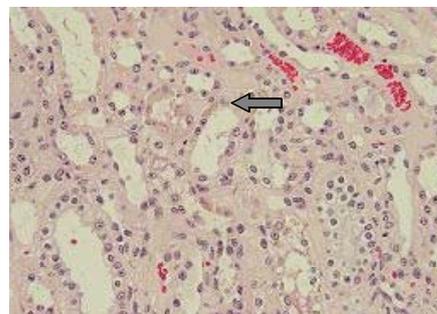
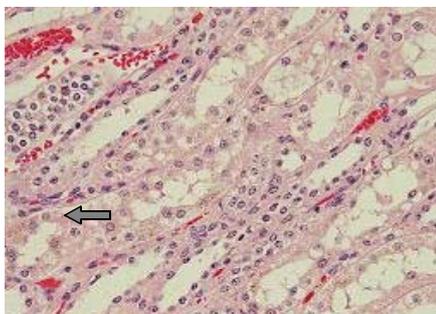


図5 腎臓の組織写真(左：「アイ」、右：娘牛「ミント」)
注) 矢印はリボスチン色素の沈着

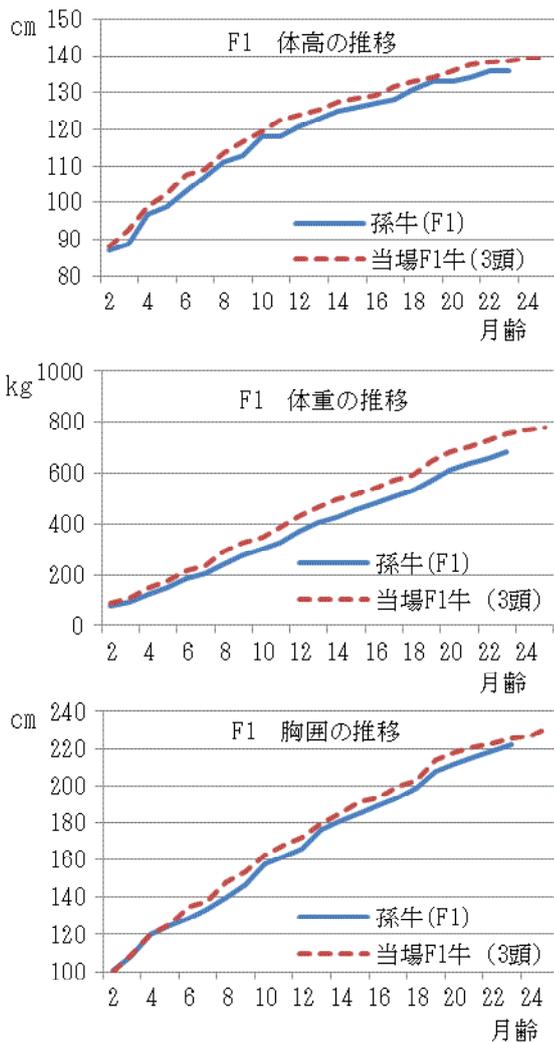


図6 孫牛 (F1) の発育 (肥育) の推移

3 孫牛 (F1雌) の調査

(1) 出生調査

孫牛 (F1) は2006年9月1日に分娩され、生時体重33.2 kgであった。自力で起立し、初乳も2.0 kg飲み、外貌にも異常は認めなかった。

(2) 繁殖性調査

繁殖性は表3のとおり春機発動日数349日、発情周期22.0日で、雌としての生理機能が確認され、異常は認めなかった。

(3) 発育 (肥育) 調査

孫牛 (F1) は、当場で同居の一般牛 (F1) 3頭の平均に比べて、体重がやや小さい傾向であったが、体高、胸囲の推移については差は認められなかった (図6)。

(4) 解剖による調査

解剖による骨格、筋肉および生殖器等の各臓器の調査においても、異常は認められなかった。

表7 各臓器のH19 遺伝子のメチル化レベル

臓器	メチル化の程度 (%)			P値 (vs. 一般牛)	
	アイ	ミント	一般牛	アイ	ミント
心臓	32.0	35.6	27.6	0.5009	0.4779
肺	39.1	42.9	25.0	0.2014	0.1763
肝臓	22.6	53.9	56.2	0.3388	0.9223
脾臓	34.4	49.6	79.0	0.0116*	0.0778
腎臓	34.6	50.8	34.4	0.8348	0.3055
小腸	50.4	49.4	48.4	0.5668	0.6096
筋肉	66.1	57.0	40.6	0.1418	0.1182

*は $P < 0.05$ で有意差あり

表8 各臓器のPEG3 遺伝子のメチル化レベル

臓器	メチル化の程度 (%)			P値 (vs. 一般牛)	
	アイ	ミント	一般牛	アイ	ミント
心臓	54.7	39.4	37.5	0.1064	0.7503
肺	65.8	45.2	66.4	0.5803	0.073
肝臓	59.6	60.5	60.9	0.6096	0.4153
脾臓	51.6	24.6	73.3	0.2849	0.0016*
腎臓	55.9	40.4	53.2	0.1751	0.4156
小腸	67.8	59.2	70.0	0.7953	0.1475
筋肉	56.8	60.2	51.4	0.2985	0.7895

*は $P < 0.05$ で有意差あり

考 察

「アイ」は、ドナー牛との遺伝的な同一性が確認され、体細胞クローン技術により作出された牛であると判定されている。また、図1のように外観的な特徴も類似していた。

「アイ」の出生時は受胎牛の分娩予定日に合わせて分娩誘起を行い、正常に娩出することができた。特に「アイ」は雌で51 kgのやや大型の胎子であったため、体細胞クローン牛の分娩誘起処置は適切な処置であったと考えられる⁹⁾。

テロメア長に関しては、体細胞クローンで用いられるドナー細胞は培養等で細胞分裂回数に基づき短小化し、10 kbに達すると細胞増殖能を失うと言われる。また、ドナー細胞の種類によって異なり、上皮細胞由来は短くなっていたが、卵丘細胞や繊維芽細胞由来は同月齢のコントロール牛と同等であったと報告 (畜産草地研究所技術リポート12号) されている。

テロメア長の調査については、当時 (2003年) 和田ら¹⁰⁾ が報告している。ドナー牛が14歳という高齢のため、テロメア長が12 kbと短縮していたが、「アイ」の3か月齢でのテロメア長が21 kbで十分な長さにリセットされた。そのため、正常な成長を遂げたと考えられた。

体細胞クローン牛の発育、繁殖および産乳性に関しては、(独)畜産草地研究所渡邊らが、①臨床・病理、成長・発育、繁殖性及び乳肉生産(搾乳、肥育)の広範な調査分野にわたるデータを分析した結果、生後200日以上生存した体細胞クローン牛は、通常の牛と同程度に生育し、差異のない生理機能を有することが判明した。②体細胞クローン後代牛についても、同様の調査で、通常の牛との差異は認められなかったと報告している(畜産草地研究所研究資料No.9)。

「アイ」は、正常に発育し、繁殖性を備え、産乳性を比較しても有意な差がなかったことから、通常の牛と全く変わらない生理機能を有していたと判断される。このことは、娘牛「ミント」や孫牛についても同様に、正常に発育し、生理機能も備えており、山口ら¹¹⁾や笠井ら¹²⁾の報告を裏付ける結果であった。乳量については、分娩時期や飼養管理方法が大きく影響すると言われる¹³⁾。「アイ」は分娩以降、当場の慣行によるTMR給与で他の牛と同居で飼養されていたが、全国的な一般牛の乳量の範囲内であり、異常を認めなかった。

血液生化学検査では、3か月以上生存したとする体細胞クローン牛の血液成分は一般の牛と差はなかったという報告(畜産草地研究所成果情報(2003))や、泌乳期の牛の血液性状を調査したが異常を認めなかったとの報告¹⁴⁾がある。「アイ」と娘牛「ミント」についても、ほとんどの血液生化学の項目で異常値はなかったことから、一般牛と差異はないと考えられた。

体細胞クローン牛の病理学的所見では、免疫不全や甲状腺および肝臓の異常が症例として多いとの報告(畜産草地研究所研究資料No.13)があるが、今回の「アイ」と娘牛「ミント」は、甲状腺のほか、各臓器に著変はなかった。富脈斑やリポフスチンの沈着は、一般牛で見られる同じ加齢によるものと思われた。さらに、「アイ」はドナー牛の卵丘細胞を基に誕生した牛であることから、ドナー細胞に卵丘細胞を用いて生産された体細胞クローン牛の主要臓器に著変はなかったとの報告と一致するものであった¹⁵⁾。

DNAメチル化は、動物の体を正確な形にするために必要な仕組みで、細胞の種類を決めることに関わる¹⁶⁾。

「アイ」または娘牛「ミント」のDNAメチル化レベルの解析からは、一般牛と比べて脾臓で有意差はあったものの、これらの遺伝子については個体の正常な発生や

細胞の分化に関わる「エピジェネティクス」な異常はなかったと考えられた¹⁷⁾。ただ、クローンマウスでは加齢とともにメチル化の異常が消滅するという報告もあることから¹⁸⁾、「アイ」や娘牛「ミント」には、元々DNAメチル化の異常が存在しなかったか、あるいは加齢とともに異常が消失した可能性も否定できなかった。DNAメチル化レベルの解析については、(独)畜産草地研究所のさらなる調査が期待される。

今回、体細胞クローン牛とその娘牛、および孫牛の三代までが全て正常に誕生し、発育性、繁殖性等の各調査で異常を認めなかったことが大きな結果であった。一つの事例ではあるものの、体細胞クローン研究の中

で体細胞クローン由来牛の三代までを追跡した調査報告は全国的にも非常に貴重な成果であったと思われる。

体細胞クローン技術は優良な遺伝子を持つ種畜の維持や受精卵クローン技術を利用した育種改良にも応用できる。また、国内で重大な海外悪性伝染病が発生した場合に、優良種牛の遺伝資源を確保する一つの手法として必要な技術であると考えられる。

謝辞：病理学的調査や遺伝子学的調査の円滑な実施へのご協力と数々のご助言をいただいた愛知県中央家畜保健衛生所および(独)畜産草地研究所家畜育種繁殖研究領域の職員各位に深く感謝申し上げます。

引用文献

1. Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. & Campbell K.H.S., "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells", *Nature* 385, 810-813(1997)
2. Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H., and Tsunoda, Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282, 2095-2098(1998)
3. 上田淳一, 小林章二, 武井真理, 加藤泰之. 経膈採取した卵丘細胞を用いたウシ体細胞クローン産子生産. 愛知農総試研報 32, 197-202(2000)
4. 小林章二, 武井真理, 神部三智雄, 中前均. Open pulled-strawおよびStandardstrawを用いてガラス化保存したマウス胚の生存率比較. 愛知農総試研報告. 31, 225-232(1999)
5. 平山博樹. 体細胞クローン受胎牛における分娩遅延の要因. 畜産技術 6, 57. 2-6(2010)
6. 児玉英樹, 野口龍生, 鈴木暁之, 福成和博, 吉川恵郷. 優良種雄牛造成に向けた体細胞クローン牛生産技術の検討. 岩手農研セ研報. 5, 81-88(2005)
7. Liu, J.H., Yin, S., Xiong, B., Hou, Y., Chen, D.Y. and Sun, Q.Y. Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. *Mol Reprod Dev.* 75 (4), 598-607(2008)
8. Suzuki, J. Jr., Therrien, J., Filion, F., Lefebvre, R., Goff, A.K., Perecin, F., Meirelles, F.V. and Smith, L.C. Loss of methylation at H19 DMD is associated with biallelic expression and reduced development in cattle derived by somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.* 84(5), 947-956(2011)
9. 谷口俊二, 柏木敏孝, 野口浩和, 山本喜彦. 体細胞クローン牛の作出および相似性の検討. 和歌山農林水技セ研報. 4, 57-61(2002)
10. 和田千雅, 上田淳一, 小林章二. 体細胞クローン牛の発育とテロメア長. 関東東海北陸農業研究成果情報 Vol.2002, No.1, 46-47(2003)
11. 山口大輔, 渡辺晃行, 足立憲隆. 体細胞クローン

- 牛の発育及び繁殖能力. 茨城畜産研報. 37, 79-84 (2004)
12. 笠井幸治, 佐野文彦, 齋藤美英. クローン牛の遺伝的相似性及び繁殖に関する検討. 静岡畜試研報. 31, 27-30 (2005)
13. 笠井裕明, 福見善之, 後藤充宏, 渡辺裕恭, 片山正敏. ホルスタイン種体細胞クローン牛1頭の発育・泌乳状況調査. 徳島畜研研報. 2, 1-7 (2012)
14. 小西一之, 米内美晴, 金山佳奈子, 別府哲郎, 今井敬. ホルスタイン種体細胞クローン牛の初産泌乳期における血液生化学成分の推移. 日本畜産学会報. 82(1), 17-24 (2011)
15. 長谷川清寿, 佐々木恵美, 安部亜津子, 村尾克之, 高仁敏光. ホルスタイン種雌牛由来卵丘細胞から作出したクローン個体とその後代産子に関する生理学的小よび病理学的観察. 島根畜試研報. 38, 1-5 (2005)
16. 志村英明, 梅木英伸, 藤田達男, 志賀一穂. 体細胞クローン牛生産技術の確立に関する研究. 大分県農水研指セ試験成績報告. 33, 23-29 (2004)
17. 澤井健. ウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現制御機構. 東北畜産学会報 60(3), 74-79 (2011)
18. Senda, S., Wakayama, T., Arai, Y., Yamazaki, Y., Ohgane, J., Tanaka, S., Hattori, N., Yanagimachi, R. and Shiota, K. DNA methylation errors in cloned mice disappear with advancement of aging. Cloning and Stem Cells. 9(3), 293-302 (2007)